基于噬菌体展示技术抗黄曲霉毒素 B1 单链抗体的筛选及其蛋白结构分析[1]

庞倩，陈晶，王小红，王佳*

(华中农业大学　食品科技学院，武汉 430070)

摘要：黄曲霉毒素 B1（Aflatoxin B1，AFB1）是一种毒性强、污染广的真菌毒素，建立高效、准确、快速的 AFB1 检测方法具有重要意义。利用噬菌粒-辅助噬菌体展示系统构建单链抗体(single chain variable fragment，scFv)文库，应用"淘选-洗脱"的策略，是筛选高亲和配体的常用方法之一。同时结合同源建模和分子对接等计算机辅助手段，分析得到抗体与抗原的结合位点与关键氨基酸，为在基因水平改造抗体提供基础。本研究从 AFB1-BSA 免疫小鼠的脾细胞内扩增重链可变区和轻链可变区,将组合成的 scFv 片段插入噬菌粒 pCANTAB5e 中，构建了噬菌体展示单链抗体文库，以不同浓度的 AFB1-OVA 作为抗原，从文库中筛选到一株亲和力较好的抗 AFB1 单链抗体 scFv，其亲和常数为 8×10^5 L/mol；根据同源建模和分子对接发现，与抗原 AFB1 结合时，scFv 中 Tyr33、Ser52 和 Tyr102 起关键作用，分别以π-π共轭键、氢键和范德华力与 AFB1 结合。

关键词：黄曲霉毒素 B1；单链抗体；噬菌粒-辅助噬菌体展示；同源建模；分子对接

黄曲霉毒素 B1（Aflatoxin B1，AFB1）是一种毒性强、污染广的真菌毒素，主要由黄曲霉菌（*A. flavus*）、寄生曲霉（*A. parasiticus*）产生，常污染于大麦、花生、玉米、高粱、大豆等农作物[1]，已被国际癌症研究机构（International Agency for Research Center，IARC）列为 I 类致癌物质[2]（IARC 1993）。AFB1 稳定性好，普通的烹饪加工难以使其降解，因此建立高效、准确、快速的 AFB1 检测方法尤为重要。免疫分析方法是一类基于抗原抗体特异性反应快速检测方法，具有检测通量高、灵敏度高、操作简单快速等优点，已经广泛应用在食品和环境中 AFB1 的检测中。抗体作为免疫分析的核心试剂，其理化性质和亲和性直接影响着免疫分析方法的灵敏度。其中，单克隆抗体和多克隆抗体作为经典的抗体类型，已经成功的用于 AFB1 的检测[3-5]。但是这些抗体分子量大、免疫原制备复杂、受动物个体的影响大等[6,7]，导致研发成本高、批次间差异大等问题。而以单链抗体(single chain antibody fragment，scFv)为代表的基因工程抗体，其分子量小（28kD）、对试验动物的依赖小，可以利用基因工程的方法体外改造提高亲和

1基金项目：国家自然科学基金项目(31601539)；湖北省自然科学基金项目(2016CFB143)；华中农业大学自主科技创新基金项目(2662015QD027)。
作者简介：庞倩，女，食品科学专业，在读研究生，E-mail：270315863@qq.com
通讯作者：王佳，女，博士，讲师，研究方向：食品安全检测技术。E-mail：wangjia@mail.hzau.edu.cn

力，从而降低了抗体制备的难度，是一类有应用前景的抗体[8]。

目前，制备 scFv 一般有两种途径，1）提取阳性单克隆杂交瘤细胞的 RNA，体外利用柔性接头将其重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 连接，虽然避免了文库构建和筛选等繁琐的步骤，但此法制备的 scFv 亲和力与原单克隆细胞株相比明显降低[9]；2）制备免疫原免疫小鼠，从免疫小鼠的脾细胞中提取 RNA，通过特异性引物扩增其 VH 和 VL 片段，构建基于噬菌体展示技术的单链抗体文库[10,11]，通过“淘选-特异性洗脱”的方式，从文库中淘选得到高亲和力的 scFv 抗体。基于噬菌粒-辅助噬菌体展示系统是近年来应用最广泛的噬菌体展示体系之一，噬菌粒载体基因组较小、易于操作，有利于较大蛋白的表达，避免了较大的外源 DNA 插入噬菌体基因组而影响噬菌体自身的生命活动；噬菌粒载体和辅助噬菌体抗性不同，有利于筛选出同时含有噬菌粒载体和辅助噬菌体的细胞[12]；噬菌粒-辅助噬菌体系统依然可以将 DNA 序列与外源蛋白联系起来，便于进行后续基因改造和体外亲和力成熟等研究。Daly 等[13]通过特异性扩增 VH 和 VL 片段，构建了基于噬菌粒-辅助噬菌体展示系统的抗 AFB1 scFv 文库，库容量为 10^9cfu/μg。同时结合计算机模拟和分子对接的方法，可以得到与 scFv 同源的三维空间结构，并找出与抗原结合的关键氨基酸，为抗体体外亲和力成熟提供基础。Hu 等[14]发现其以噬菌体展示获得的一株高亲和力抗伏马菌素 B1 scFv，伏马菌素 B1 嵌入抗体形成的空腔中；借助同源建模和分子对接手段，在抗 AFB1 scFv 的 H44 和 L100 之间加入二硫键增加了 scFv 稳定性而不影响其亲和力[15]。

本研究以 AFB1 为研究对象，选择抗血清效价高的免疫小鼠，通过设计特异性引物扩增 VH 和 VL 区域，构建基于噬菌粒-辅助噬菌体系统的抗 AFB1 单链抗体文库，利用“结合-洗脱”的淘选策略从文库中筛选抗 AFB1 单链抗体，并分析该 scFv 基本性质，同时辅助同源建模和分子对接的手段，构建了 AFB1 与 scFv 结合模型，找出关键结合位点氨基酸，为后续 scFv 的性质优化、体外亲和力成熟等提供实验指导。

1.材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

6 周龄雌性 Balb/c 小鼠（湖北省实验动物研究中心）；*E.coli* TG1、载体 pCANTAB5e（北京宝科维食安生物技术有限公司）；辅助噬菌体 M13KO7、HRP 标记 anti-M13 抗体（美国 GE 公司）；Easy Taq 酶、DNA Marker、限制性内切

酶 *Sfi*I、*Not*I、*Nde*I 和 *Xho*I（美国 New England Biolab 公司）；TRIzol®Reagent RNA 提取试剂盒（美国 Thermo 公司）、QIAGEN Plasmid Mini Kit、QIAquick Gel Extraction Kit（美国 QIAGEN 公司）；AFB1 标准品（美国 sigma 公司）；RevertAidTM cDNA 单链合成试剂盒（美国 Roche 公司）；其它有关试剂均为国产分析纯。

T100™Thermal Cycler PCR 仪、凝胶成像系统分析仪（美国 Bio-Rad 公司）；Biorad 5810R 冷冻高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；

1.2 实验方法

1.2.1 动物免疫

初免时，将 AFB_1-BSA 与等量的弗氏完全佐剂乳化，采用背部皮下多点注射的方式免疫小鼠，间隔 30 d 后，以同等剂量的免疫原与等量弗氏不完全佐剂乳化，免疫剂量均为 50 μg/只。每次免疫后的第 10 d，断尾取血，参考文献[16]测定抗血清效价。

1.2.2 scFv 的扩增与拼接

选取效价最高的小鼠，利用 TRIzol®Reagent 提取其脾脏的 RNA，用液氮将脾脏磨成粉状后，加入 1 mL 的 Trizol 试剂混合均匀，于室温下静止 30 min，待粉末完全溶解后加入 300 μL 的三氯甲烷，混合均匀后静止 10 min，14000 rpm 离心 15 min，将 500 μL 上清转移至无菌离心管，再加入 800 μL 的异丙醇，静止 10 min，14000 rpm 离心 15 min，用 70%乙醇悬浮沉淀两次，离心后加入 50 μL 的 DEPC 处理过的无菌水溶解 RNA，取少量 RNA 测定浓度和琼脂糖凝胶电泳检测。

以 mRNA 为模板，反转录生成 cDNA，以 1μL cDNA 为模板，参照沈倍奋[17]设计特异性引物扩增 VH 和 VL 基因，以等量的 VH 和 VL 基因片段互为模板，进行第一轮融合 PCR，使其随机拼接为 scFv 基因，PCR 反应条件参考文献[17]，反应完成后，于体系中加入带 *Sfi*I 酶切位点（识别序列 GGCCCAGCCGGCC）的 VH5’端引物以及带 *Not*I 酶切位点（识别序列 GCGGCCGC）的 VL3’端引物，进行第二步 PCR 扩增。

1.2.3 噬菌体抗体库的构建、鉴定与淘选

用限制性内切酶 *Sfi*I 和 *Not*I 对 scFv 基因与质粒 pCANTAB5e 进行双酶切，经 T4 DNA 连接后转化至感受态 *E. coli* TG1 细胞中，取 100 μL 培养液涂布于 2×YT 固体培养基（氨苄青霉素 100 μg/mL）。根据平板上的菌落数，推算抗体

库的库容，随机挑取单克隆测序鉴定。

阳性噬菌体的淘选和扩增参考文献[18]，以 100 μL 20 μg/mL AFB1-OVA 包被 96 孔酶标板，4 °C 过夜，次日弃包被液，PBST 洗板 3 次。用 2%脱脂牛奶封闭，PBST 洗板 3 次。加入 100 μL 噬菌体抗体库，37 °C 孵育 2 h，PBST 洗板 10 次，甩干。加入 200 μL Gly-HCl 缓冲液，37 °C 轻柔振荡洗脱 6 min，立即加入 25 μL Tris-HCl 缓冲液（pH8.9）中和洗脱液。收集洗脱液感染 *E. coli* TG1（OD_{600nm}=0.4），一部分用来测定滴度，其余的噬菌体用 PEG/NaCl 溶液沉淀扩增噬菌体，进行下一轮淘选。重复上述"淘选-富集"4 次，包被抗原 AFB1-OVA 浓度分别为 20 μg/mL 、20 μg/mL 、10 μg/mL、10 μg/mL。

1.2.4 scFv 噬菌体克隆的初步鉴定与序列分析

从第 5 轮测定洗脱噬菌体浓度的抗性平板上分别挑取 46 个单克隆，用 phage ELISA 检测：AFB1-OVA(包被缓冲液稀释) 4 °C 包被过夜，3%脱脂牛奶封闭 2h，PBST 洗板三次，甩干，加入噬菌体单克隆上清液，PBST 洗板 3 次后加入 HRP 标记的 anti-M13 二抗，孵育 1h 后加入 TMB 底物显色，读取 450nm 处吸光值。

根据参考文献[19]定义待测样品的 OD_{450nm} 值为 P，阴性对照的 OD_{450nm} 值为 N，当 P/N≥2.1 时判定为阳性克隆，P/N＜1.5 为阴性克隆。

提取阳性噬菌体克隆的质粒，以 pCANTAB5e 的通用引物 S1 和 S6 测定其 DNA 序列。

1.2.5 阳性 scFv 原核表达与纯化

设计带有 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切位点及 His-Tag 的 PCR 引物扩增阳性 scFv，与 pET-30a 质粒连接构建 pET-30a-scFv 重组质粒，验证后转入感受态 *E. coli* BL21（DE3）中诱导表达。待菌液 OD_{600nm} 在 0.6-1.0 之间时，加入终浓度为 1 mM 的 IPTG，于 18 ℃进行诱导表达 16 h。收集菌体进行超声波破碎，菌液离心后沉淀中加入 PBS 缓冲液混匀，冰浴环境下超声破碎，条件为 2 s on、2 s off、功率 100 W、时间 30 min。离心后，上清液用 Ni-NTA 进行纯化，采用 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.2.6 scFv 性质表征

通过 ExPASy 网站的 Protparam tool 软件（https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam）在线预测抗 AFB1 scFv 的理论分子量、等电点、热稳定指数、消光系数及平均亲水性等性质参数。

测定抗体亲和常数的方法有很多，不同方法测定的亲和常数值也有一定的差异。本研究在测定单链抗体滴度的基础上，参考 Beatty[20]测定抗体亲和力常数的方法，对单链抗体的亲和常数进行了计算，其原理为：在酶标抗原浓度不变的情况下对抗体进行梯度稀释，设定抗体浓度很高时与酶标抗原的结合率为 100%，则结合率为 50%所对应的抗体浓度的倒数值即为亲和力。抗体亲和常数计算公式：

$$亲和常数\ K = \frac{抗体分子量}{滴度 \times 抗体浓度}$$（其中抗体浓度单位为 mg/mL）

1.2.6 同源建模与分子对接

在分子建模服务系统 SWISS-MODEL（http://swissmodel.expasy.org/）中输入 scFv 的氨基酸序列，通过序列比对，找到与目标蛋白相似性较高并具有已知结构的序列作为模板。使用 DS 软件中的 Align Structures（MODELER）命令，对模板进行结构比对。使用 Align Multiple Sequences 命令将推定的 scFv 的氨基酸序列与比对后的模板进行对比。使用 Build Homology Models 命令进行同源建模。选择 PDF Total Energy 数值最小的模型作为初始模型，使用 Model Antibody Loops 命令对抗体的可变区进行优化得到最终模型。使用 Ramachandran Plot 命令绘制拉氏图，对最终模型进行评价。

通过 PubChem（http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#opennewwindow）下载 AFB_1 的 3D 结构。使用 Dock Ligands 命令将 scFv 与 AFB_1 进行分子对接。使用 Receptor-Ligand Hydrogen Bonds 和 Receptor-Ligand Bumps 命令预测分子间的作用力。使用 Draw Ligand Interaction Diagram 命令绘制 2D 分子间作用力图。分析 scFv 与 AFB1 的结合作用和关键结合位点。

2.结果与分析

2.1 VH 和 VL 基因的扩增及 scFv 的组装

小鼠五免后血清效价为 2×10^6，提取其脾细胞总 RNA，以该 RNA 为模板，反转录后特异性扩增 VH 和 VL 基因片段，均扩增得到单一特异性条带，回收 VH 和 VL 基因片段后，定向扩增 VH-linker-VL 构建单链抗体基因，大小为 750bp 左右，结果如图 1，基因片段大小与理论值相符。

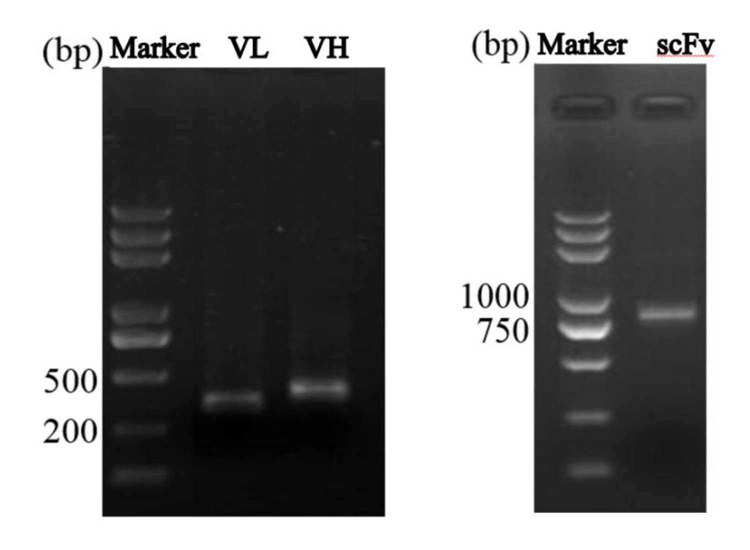


图 1 可变区 VH 与 VL 基因扩增与 scFv 构建

Fig.1 Amplifying VH and VL gene and construction of scFv

2.2 抗 AFB1 噬菌体展示抗体文库的构建与淘选

噬菌粒转化大肠杆菌后，平板计数推算出噬菌体 scFv 抗体库容约为 5×10^{6} cfu/mL，辅助噬菌体超感染后得到噬菌体展示 scFv 文库库容量为 2×10^{13} pfu/mL。本研究得到的抗体文库库容比报道的文献低了 2-3 个数量级[15,16]，库容量是评价文库质量的重要指标之一，也是能否淘选到阳性克隆的重要条件之一。

5 轮淘选后，测定每轮投入和洗脱的噬菌体的滴度，如表 1 所示，随着筛选次数的增加，第五轮筛选后捕获的噬菌体与第一轮相比，富集了 6.96 倍。从 5 轮筛选后的平板上随机挑取 92 个单菌落，用 phage ELISA 测定培养后上清液与抗原的结合能力，以 P/N 值(阳性孔 OD 值/阴性孔 OD 值)≥2.1 判定为阳性克隆。经测定后，共得到 13 株阳性克隆。提取质粒后测序，13 株阳性克隆均为同一 DNA 序列，翻译成氨基酸序列（图 2），黑色划线部分为 VH 与 VL 的 Linker，将该阳性序列命名为 scFv。

表 1 免疫亲和筛选对抗 AFB_1 噬菌体单链抗体的富集

Table 1. The enrichment of phage display anti-AFB_1 scFv by immunoaffinity panning

筛选次数	AFB_1-OVA 浓度（μg/mL）	噬菌体投入量 (cfu/mL)	噬菌体捕获量 (cfu/mL)	富集度
1	20	2.1×10^{13}	5×10^{2}	—
2	20	1.3×10^{13}	9×10^{2}	2.875
3	20	1.5×10^{13}	1.2×10^{3}	1.153
4	10	2.5×10^{13}	1.6×10^{3}	0.8
5	10	1.8×10^{13}	3×10^{3}	2.61

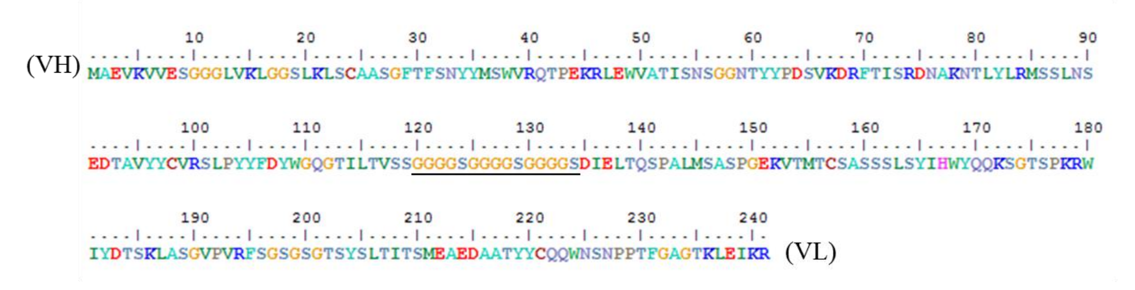


图 2 抗 AFB1 scFv 的氨基酸序列（划线处为 linker）

Fig.2 Amino acid sequences of anti-AFB1 scFv (underlined part was the Linker sequence)

2.3 抗 AFB1 scFv 的重组表达性质分析

重组表达载体 pET-30a-scFv 构建后，转入 *E. coli* BL21（DE3）中诱导表达，采用 SDS-PAGE 分析脱盐纯化后的重组蛋白 scFv 的表达情况。结果如图 3，scFv 表达的分子量约为 28kDa，是可溶性表达。

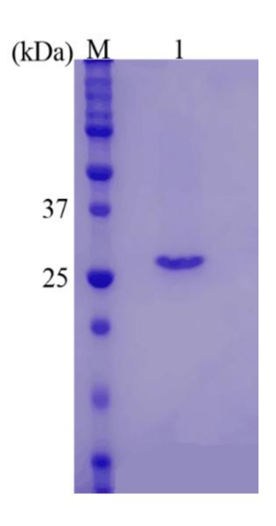


图 3 scFv-A/B 纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis for expression of scFv-A/B

M：蛋白 Marker　　1：纯化后的 scFv

用 Protparam tool 软件在线预测抗 AFB1 scFv 的理论分子量、等电点、热稳定指数、消光系数及平均亲水性等性质参数。结果表明：抗 AFB1 scFv 理论分子量为 25.8 kDa，理论等电点为 8.56，亲水系数（GRAVY）为-0.366，负值表示具有亲水属性。不稳定系数为 54.93，稳定性欠佳，这也是 scFv 应用受到限制的主要原因之一[13]。通过亲和力测定，按照其计算公式计算, scFv 的亲和常数为 8×10^5 L/mol。

2.4 scFv 的生物信息学分析

2.4.1 scFv 的同源建模与分子对接

通过同源建模及抗体 Loop 环优化，获得了 scFv 的 3D 结构模型，如图 4A。蓝色标识的部分为重链区，红色标识的部分为轻链区。重链区和轻链区共同形成了一个口袋区，推测其具有与抗体高度结合的可能性。

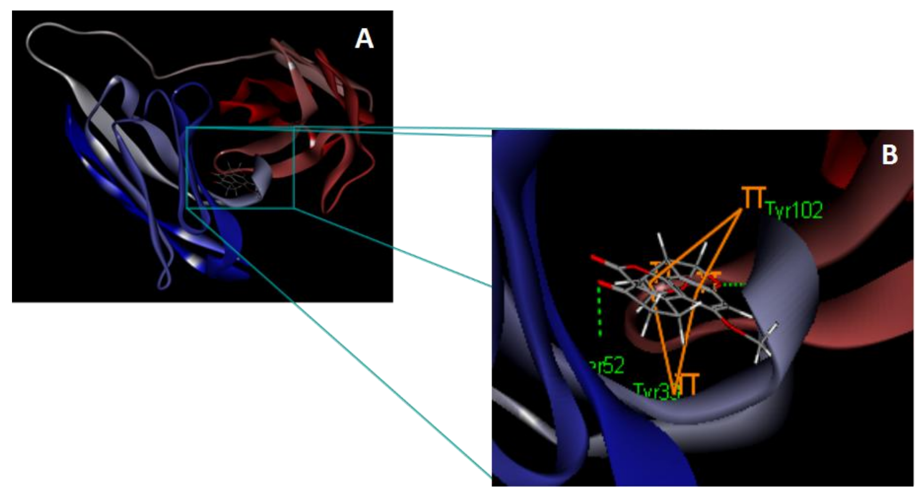


图 4 scFv-AFB$_1$ 三维模型图（A）及与 AFB1 的分子对接结构图（B）

Fig.4 3D model of anti-AFB1 scFv (A) and its molecular docking model with AFB$_1$ (B)

同时，拉氏图结果表明，scFv 的 3D 结构模型中氨基酸空间取向不合理的频率为 13/226（5.7%），处在优秀模型的区间≤10%，判断为高质量拉氏图，因此所建三维模型合理。且空间取向不合理的氨基酸大部分为连接重链与轻链的链接肽上，此类氨基酸的空间取向对分子对接结果的影响甚微。

根据构建的 3D 结构及下载的小分子模型，模拟了两者结合时的空间构象。scFv 与 AFB1 的结合位点为重链上的 Tyr33、Ser52 和 Tyr102，与 Tyr33 的结合方式为π-π共轭键，与 Ser52 的结合方式为氢键，与 Tyr102 的结合方式为π-π共轭键及范德华力，如图 4B 和图 5。

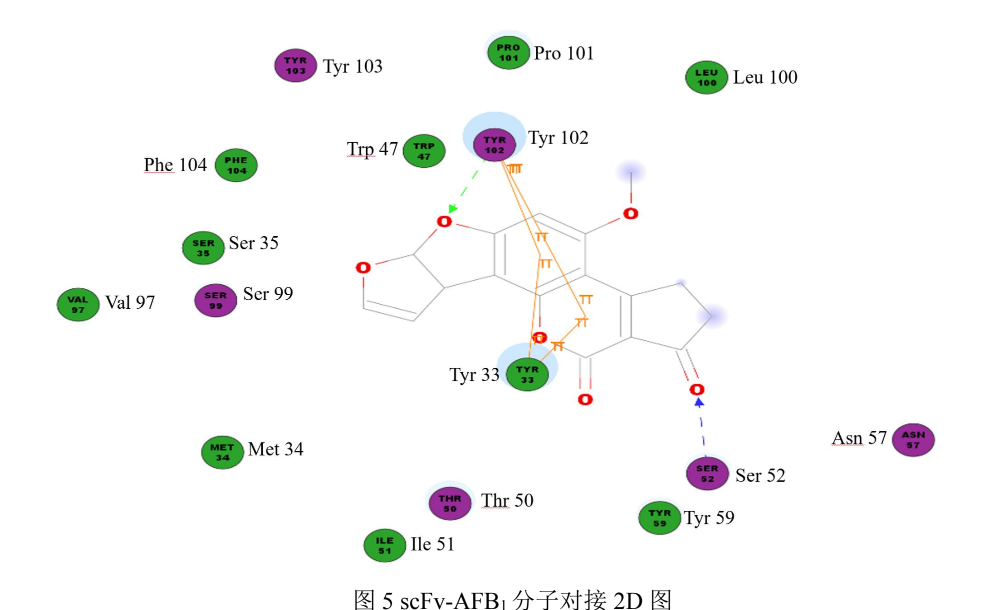


图 5 scFv-AFB_1 分子对接 2D 图

Fig. 5 2D molecular docking model scFv and AFB_1

3.讨论

噬菌体抗体库是制备抗体常用的技术之一，本实验通过免疫小鼠，扩增其抗体可变区基因，构建抗 AFB_1 单链抗体基因文库，库容为 10^6 数量级，库容较小，可能是由于采用 $CaCl_2$ 化学转化，因此后续可尝试采用电穿孔法进行转化，减少建库过程中单链抗体基因的损失，以提高转化效率和库容量[21]；同时利用 Cre-LoxP 体内重组体系统构建噬菌体抗体库也是提高库容的有效方法之一，孙巍等[22]通过在初级库中引入 Cre-LoxP 同源重组系统，使得不同抗体基因之间互相自由组合，库容和多样性翻倍，获得了 10^{11} 数量级的噬菌体抗体库。

单链抗体的优势在于分子量较小，只有普通抗体的 1/4，溶解性和组织渗透性也更好。在本研究中，从噬菌体展示抗体文库中经过五轮筛选得到一株亲和力较高的单链抗体 scFv，亲和常数为 8×10^5 L/mol，与参考文献[23,24]比对略低，可能是由于将抗体 VH 和 VL 通过短肽连接形成，亲和力往往比原始抗体差[25]。体外改造抗体亲和成熟是一种非常高效的提高抗体亲和力的方法[26]，体外亲和成熟通常有以下几种方式：错误倾向 PCR（error-prone PCR）引进点突变[27]；重组改造与抗原结合起主要作用的 CDR 区域，对抗体的 CDR3 区域进行重组可极大提高抗体亲和力[28]，对 CDR3 区氨基酸序列的随机化，也在一定程度上也提高了抗体合成文库的多样性及容量，经过 CDR3 改造的文库库容可达 10^9 以上[29]；链替换技术，孙丽娜等[30]通过置换轻链可变区，构建重链置换抗体库筛选得到特异性结

合狂犬病毒糖蛋白人源抗体的亲和力达到 10^9 数量级；DNA 改组，有研究者[31]联合采用 error prone-PCR 和 DNA 改组技术随机突变抗肝癌单链抗体的重链和轻链可变区,得到的抗体不仅保持了原始抗体的特异性，同时亲和力提高了 2 倍以上。

同时，文库来源、构建方法及抗体类型等均会在一定程度上影响抗体与 AFB1 的结合方式和结合能力（表 2）[32-35]。利用同源建模对 scFv 的三级结构进行预测，再将 scFv 的 3D 结构与 AFB_1 模型进行分子对接，优化后得到最为稳定的对接结构，根据对接的 3D 和 2D 图可以清楚地找出 scFv 在与抗原 AFB_1 结合过程中起关键作用的氨基酸，以及抗原抗体的结合方式。本研究后续可以利用定点饱和突变技术对该 scFv 进行体外亲和力优化，通过对关键氨基酸进行定点突变以获得分别被其他 19 种天然氨基酸所代替的突变子，构建抗 AFB1 单链抗体定点饱和突变库，同时对 CDR3 区氨基酸序列进行随机化，以期筛选得到亲和力较好的 scFv，为生物信息学在抗 AFB1 抗体筛选领域的发展提供有利支撑。

表 2 不同类型的抗体与 AFB1 结合方式的比较

Table 2 Comparison of the binding mode of different antibodies to AFB1

抗体名称	抗体类型	构建方法	与 AFB1 的结合方式	参考文献
Nb-G8	纳米抗体	噬菌体展示纳米抗体免疫文库	Thr32、Ile33、Phe49、Typ54 、Tyr106 和 Val112 等氨基酸残基可能直接参与抗原识别表位的形成	[32]
scFv-H4	单链抗体	Tomlinson I+J 文库	AFB1 主要被轻链上的 Ala91、Pro95、Phe98 和重链上的 Lys96、Thr97、His95 构成疏水腔包裹，双呋喃环与 Asp 之间形成氢键	[33]
1C11	单克隆抗体	杂交瘤细胞株	1C11 重链上的 Ser49 和 Phe103 以氢键与疏水作用与 AFB1 结合	[34]
scFv	单链抗体	抗 AFB1 单克隆抗体杂交瘤细胞株	在三级结构中连接肽将 VH 和 VL 区域牵拉而相互靠近，形成典型沟槽结构，是 scFv 的抗原结合区域	[35]
scFv	单链抗体	噬菌粒-辅助噬菌体展示系统构建的单链抗体文库	与抗原 AFB1 结合时，scFv 中 Tyr33、Ser52 和 Tyr102 起关键作用，分别以π-π共轭键、氢键和范德华力与 AFB1 结合	本研究

参考文献

[1] 刘爱平, 李诚, 刘书亮, 等. 抗黄曲霉毒素 B1 单链抗体在 Sf9 昆虫细胞中的表达与性质分析[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(5):40-45.

Liu A., Li C, Liu S L, et al. Expression and Characterization of Anti-AFB1 scFv Expressed in Sf9 Cell. China Biotechnology, 2016, 36(5): 40-45.

[2] IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. [M]. Geneva: World Health Organization, 1993, 489-521..

[3] Liu J W, Lu C C, Liu B H, et al. Development of novel monoclonal antibodies-based

ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic strip for aflatoxin B1 detection[J]. Food Control, 2016, 59: 700-707.
[4] Shen X, Chen J, Li X, et al. Monoclonal antibody-based homogeneous immunoassay for three banned agonists and molecular modeling insight[J]. Food & Agricultural Immunology, 2017(7): 1-12.
[5] Marla D, Swain a, George P, et al. Immunodiagnostic reagents using llama single domain antibody–alkaline phosphatase fusion proteins. Analytical Biochemistry, 2011,417(2) : 188-194.
[6] Kijanka M, Dorresteijn B, Oliveira S, et al. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors[J]. Nanomedicine, 2015, 10(1): 161-174.
[7] Chen J, He Q H, Xu Y, et al. Nanobody medicated immunoassay for ultrasensitive detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein[J]. Talanta, 2016, 147:523-530.
[8] 温杰，宋琳琳，张莹等. 稳定表达 Aβ特异性单链抗体的哺乳动物细胞株构建和功能研究[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(2):1-7.
Wen J, Song L L, Zhang Y, et al. Construction and Function of Stable Mammalian Cell Lines Expressing the Aβ-specific Single Chain Fragment Variants. China Biotechnology, 2017, 37(2): 1-7.
[9] Hu Z Q, Li H P, Liu J L, et al. Production of a phage-displayed mouse scFv antibody against fumonisin B1 and molecular docking analysis of their interactions[J]. Biotechnology & Bioprocess Engineering, 2016, 21(1): 134-143.
[10] Edupuganti S R, Edupuganti O P, O'Kennedy R. Biological and synthetic binders for immunoassay and sensor-based detection: generation and characterisation of an anti-AFB(2) single-chain variable fragment (scFv)[J]. World Mycotoxin Journal, 2013, 6(3): 273-280.
[11] Wang R, Gu X, Zhuang Z, et al. Screening and molecular evolution of a single chain variable fragment antibody (scFv) against Citreoviridin toxin[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(40): 7640.
[12] Ridgeway I. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworfh 1988: 467–492.
[13] Daly S., Dillon P., Manning B. et al. Production and Characterization of Murine Single Chain Fv Antibodies to Aflatoxin B 1 Derived From a Pre-immunized Antibody Phage Display Library System[J]. Food and Agricultural Immunology, 2002, 14: 255-274.
[14] Hu Z Q, Li H P, Liu J L, et al. Production of a phage-displayed mouse scFv antibody against fumonisin B1 and molecular docking analysis of their interactions[J]. Biotechnology & Bioprocess Engineering, 2016, 21(1): 134-143.
[15] Zhao J., Yang L., Gu Z. et al. Stabilization of the Single-Chain Fragment Variable by an Interdomain Disulfide Bond and Its Effect on Antibody Affinity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 12(1): 1-11.
[16] Wang J, Li H, Shelver W L, et al. Development of a monoclonal antibody-based, congener-specific and solvent-tolerable direct enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in environmental samples.[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2011, 401(7): 2249-58.
[17] 沈倍奋，陈志南，刘民培. 重组抗体[M]. 科学出版社, 2005.
Shen B., Chen Z., Liu M., Recombinant Antibody. Science Press, Beijing, 2005.
[18] 庞倩，马榆，李诚，等. 基于 CDR2 和 CDR3 区随机突变筛选抗黄曲霉毒素 B1 单域重链抗体的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(7): 21-26.
Pang Q, Ma Y, Li C, et al. Screening of anti-Aflatoxin B1 single domain heavy chain antibody

based on random mutation of CDR2 and CDR3 regions. China Biotechnology, 2016, 36(7):21-26.
[19] Ebel G.D., Dupuis A.P., Nicholas D. Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Antibodies to West Nile virus in Birds. Emerging Infectious Diseases. 2002, 8(9): 979-982
[20] Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. Journal of Immunological Methods, 1987, 100(1):173-179.
[21] 陈英, 庄延. 活体电穿孔法基因导入技术[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(5):104-108.
Chen Y, Zhuang Y. In Vivo Transfer with Electroporation. China Biotechnology, 2003, 23(5): 104-108.
[22] 孙巍, 林珩, 花芳，等. 优化宿主菌在重组系统中构建大容量天然噬菌体抗体库[J]. 药学学报, 2013, 48(1): 66-70.
Sun W, Lin H, Hua F, et al. Optimizing the host bacteria to make a large naive phage antibody library in the recombination system. Acta Pharmaceutica Sinica, 2013, 48 (1): 66−70.
[23] 蒋家豪, 孙福谋, 韩月，等. 噬菌体展示全人源抗 GPC3 的单链抗体的筛选及鉴定[J]. 药学学报, 2017,52(12):1877-1883.
Jiang J., Sun F., Han Y, et al. Screening and characterization of human anti-GPC3 single chain Fv antibody fragment selected by phage display. Acta Pharmaceutica Sinica, 2017, 52 (12): 1877-1883.
[24] 佟振华, 钱尼良, 张晶，等. 人源抗转铁蛋白受体单链抗体的筛选及其构建与表达[J]. 生物技术通讯, 2016, 27(3):358-361.
Tong Z., Qian N., Zhang J, et al. Screening, Construction and Expression of Human Anti-TfR scFv Antibody. Letters In Biotechnology. 2016, 27(3): 358-361.
[25] Liu A, Yang Y, Chen W, et al. Expression of V H -linker-V L, orientation-dependent single-chain Fv antibody fragment derived from hybridoma 2E6 against aflatoxin B 1, in Escherichia coli[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(2): 255-262.
[26] Nossal G J V. The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response[J]. Cell, 1992, 68(1):1-2.
[27] Unkauf T, Hust M, Frenzel A. Antibody Affinity and Stability Maturation by Error-Prone PCR[J]. Methods Mol Biol, 2018: 393-407.
[28] D'Angelo S, Ferrara F, Naranjo L, et al. Many Routes to an Antibody Heavy-Chain CDR3: Necessary, Yet Insufficient, for Specific Binding. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 395-408.
[29] Yan J, Li G, Hu Y, et al. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. Journal of Translational Medicine, 2014, 12(1): 343.
[30] 孙丽娜, 刘洋, 李川，等. 人源抗狂犬病毒糖蛋白Ⅲ号表位链置换基因工程抗体研究[J]. 病毒学报, 2016,32(4): 393-398.
Sun L., Liu Y, Li C, et al. Generation of Human ScFv Antibodies for Antigenic Site Ⅲ of Rabies Virus Glycoprotein from Antibody Libraries by Chain Shuffling. Chinese Journal of Virology, 2016, 32(4): 393-398.
[31] 卢筱华, 杨冬华, 周旻，等. 抗肝癌单链抗体体外亲和力成熟的改造及意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(3):192-195.
Lu X., Yang D., Zhou M, et al. Affinity maturation of a single-chain antibody against hepatocellular carcinoma. Chin J Hepatol, 2006, 14(3):192-195.
[32] 曹冬梅. 抗黄曲霉毒素 B1 纳米抗体的免疫学性能分析及其体外定点改造[D]. 江西：南

昌大学，食品学院，2016.
Cao D. Immunoassay of Nanobody against Aflatoxin B1 and Its Modification by Site-directed Mutagenesis in Vitro. Jiangxi: Nanchang University, school of food science &technology, 2016.
[33] 杨炼. 抗黄曲霉毒素 B1 的单链抗体的筛选、表达与改造[D]. 江苏：江南大学，食品学院，2010.
Yang L. Improvement of anti-aflatoxin B1 Single Chain Variable Fragment. Jiangsu: Jiangnan University, school of food science &technology, 2010.
[34] Li X, Li P W, Zhang Q, et al. Molecular Characterization of Monoclonal Antibodies against Aflatoxins: A Possible Explanation for the Highest Sensitivity. Analytical Chemistry, 2012, 84: 5229-5235.
[35] 马兰，刘爱平，王佳，等. 抗黄曲霉毒素 B1 单链抗体基因克隆及其结构分析[J]. 南方农业学报，2017，48(11): 2064-2070.
Ma L, Liu A., Wang J, et al. Anti-aflatoxin B1single chain antibody: Gene cloning and structure analyzing. Journal of Southern Agriculture, 2017, 48(11): 2064-2070.

Screening of Anti-Aflatoxin B1 ScFv Based on Phage Display Technology and Analysis of Its Protein Structure

PANG Qian CHEN Jing WANG Xiao-hong WANG Jia*
(College of Food Science and technology, Huazhong Agricultural University, 430070, Wuhan, Hubei)

Abstract: Aflatoxin B1 (AFB1) is a mycotoxin which has highly toxic and highly polluted. It is of great significance for AFB1 to establish an efficient, accurate and rapid detection method. Phagemid/helper phage system is one of the most common used system for single-chain antibody fragment(scFv) libraries construction. The "panning-elution" strategy is an effective method for screening ligands with high affinity. Combined with homology modeling and molecular docking, the key amino acid binding sites between antibody and antigen were analyzed to provide the basis for genetically modifying antibodies. In this study, we amplified the heavy chain variable regions and light chain variable regions from the spleen cells of AFB1-BSA immunized mice. Then assembled scFv fragment was inserted into the phagemid pCANTAB5e to construct a phage display single-chain antibody library. Using different concentrations of AFB1-OVA as a coating antigen, anti-AFB1 scFv was isolated from this library, which affinity constant is 8×10^5 L/mol. According to homology modeling and molecular docking, Tyr33, Ser52, and Tyr102 play a key role in binding with AFB1 under π-π conjugated bonds, hydrogen bonds, and van der Waals forces,

respectively.

Key words: AFB1; single-chain antibody fragment; phagemid/helper phage display; homology modeling; molecular docking